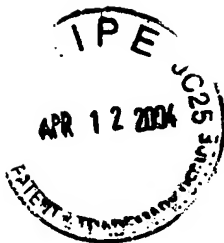


P24643.P08



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Osamu KANIE et al.

Appln No. : 10/726,550

Group Art Unit: 1614

Filed : December 4, 2003

Examiner: Unknown

For : AZASUGAR COMPOUND

**SUPPLEMENTAL CLAIM OF PRIORITY
SUBMITTING CERTIFIED COPY**

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

Further to the Claim of Priority filed December 4, 2003 and as required by 37 C.F.R. 1.55, Applicant hereby submits a certified copy of the application upon which the right of priority is granted pursuant to 35 U.S.C. §119, i.e., of Japanese Application No.2001-173855, filed June 8, 2001.

Respectfully submitted,
Osamu KANIE et al.

Bruce H. Bernstein

Reg. No. 29,027

Handwritten: 33,099

April 12, 2004
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 6 月 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 1 7 3 8 5 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 1 - 1 7 3 8 5 5]

出 願 人 三 菱 化 学 株 式 有 限 公 司
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 2 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 7 0 1 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 A11206MA

【提出日】 平成13年 6月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07H

【発明の名称】 アザ糖化合物

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市南大谷 1 1 号 株式会社三菱化学生命科学
 研究所内

 【氏名】 蟹江 治

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市南大谷 1 1 号 株式会社三菱化学生命科学
 研究所内

 【氏名】 早乙女 周子

【特許出願人】

 【識別番号】 000005968

 【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100096219

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 今村 正純

 【連絡先】 0 3 - 3 5 3 8 - 5 6 8 0

【選任した代理人】

 【識別番号】 100092635

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【選任した代理人】

【識別番号】 100104477

【弁理士】

【氏名又は名称】 藍原 誠

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

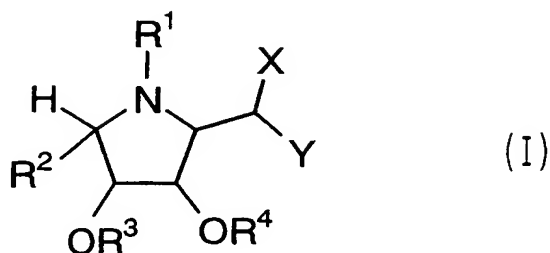
【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

- 【書類名】 明細書
 【発明の名称】 アザ糖化合物
 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式 (I) で示される化合物又はその塩。

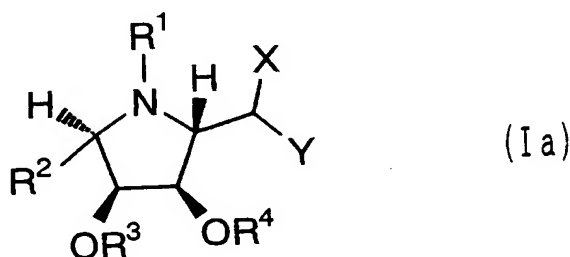
【化 1】



(式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又はNの保護基を示し； R^2 は置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2～C10のアルケニル基を示し； R^3 及び R^4 は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示し；Xは-N(R^5) R^6 を示し、 R^5 及び R^6 は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3～C10のシクロアルキル基を示し；Yは、水素原子、-CH₂NH₂、又は-CONH₂を示す。)

【請求項 2】 一般式 (I) の立体構造が以下の一般式 (Ia) であることを特徴とする、請求項 1 に記載の化合物又はその塩。

【化 2】



(式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又はNの保護基を示し； R^2 は置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2～C10のアルケニル基を示し； R^3 及び R^4 は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示し；Xは-N(R^5) R^6

-を示し、 R^5 及び R^6 は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1-C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3-C10のシクロアルキル基を示し；Yは、水素原子、 $-CH_2NH_2$ 、又は $-CONH_2$ を示す。）

【請求項3】 R^2 が $-CH_2OR^{12}$ （ただし、 R^{12} は水素原子又は水酸基の保護基を示す）である、請求項1又は2に記載の化合物又はその塩。

【請求項4】 請求項1から3の何れかに記載の化合物又はその塩を含む糖鎖関連酵素阻害剤。

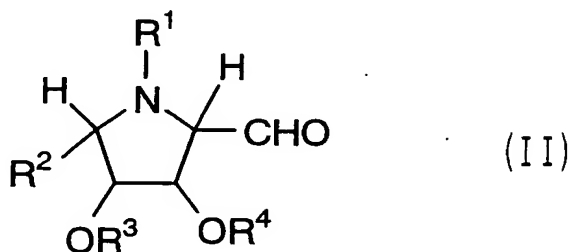
【請求項5】 請求項1から3の何れかに記載の化合物又はその塩を有効成分として含む医薬。

【請求項6】 糖鎖関連酵素の活性が上昇する疾患の治療又は予防のための医薬である、請求項5に記載の医薬。

【請求項7】 抗ウイルス剤、抗がん剤又は免疫賦活剤として使用する、請求項5又は6に記載の医薬。

【請求項8】 一般式（II）で示される化合物：

【化3】



（式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよいC1-C10のアルキル基、又はNの保護基を示し； R^2 は置換基を有していてもよいC1-C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2-C10のアルケニル基を示し； R^3 及び R^4 は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示す）

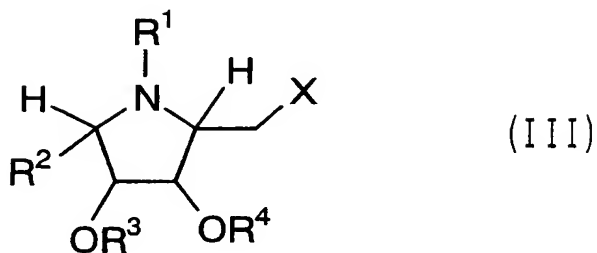
を還元剤の存在下で、

式： $X-H$

（式中、Xは、 $-N(R^5)R^6$ を示し、 R^5 及び R^6 は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1-C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3-C10のシクロアルキル基を示す）

-で示される化合物と反応させて一般式 (III) で示される化合物:

【化4】

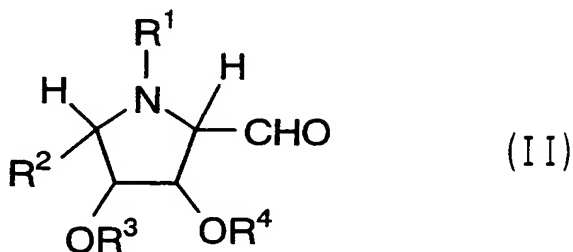


(式中、R¹、R²、R³、R⁴及びXは上記定義の通りである)

を製造する工程を含む、請求項1に記載の一般式 (I) で示される化合物の製造方法。

【請求項9】 一般式 (II) で示される化合物:

【化5】



(式中、R¹は水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又はNの保護基を示し; R²は置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2～C10のアルケニル基を示し; R³及びR⁴は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示す)

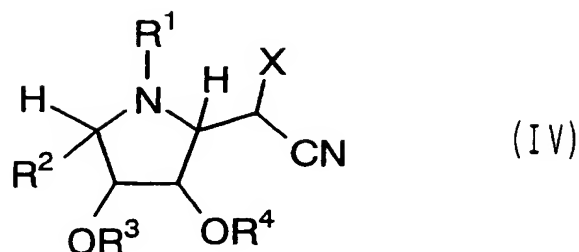
をルイス酸の存在下で、

式: X-H

(式中、Xは、-N(R⁵)R⁶を示し、R⁵及びR⁶は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3～C10のシクロアルキル基を示す)

で示される化合物及びシアノ化剤と反応させて一般式 (IV) で示される化合物:

- 【化 6】



(式中、R¹、R²、R³、R⁴及びXは上記定義の通りである)

を製造する工程を含む、請求項1に記載の一般式(I)で示される化合物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なアザ糖化合物、より詳細には糖鎖関連酵素阻害活性を有するアザ糖化合物に関する。本発明は上記アザ糖化合物を用いた医薬にも関する。

【0002】

【従来の技術】

グリコシルトランスフェラーゼ及びグリコシダーゼなどの糖鎖関連酵素 (oligosaccharide processing enzyme) は、タンパク質 (Kornfeld, R., 他 (1985). Ann.Rev.Biochem. 54, 631-664; 及びBrockhausen, I., 他 (1999). Biochim.Biophys.Acta 1473, 67-95) 及びスフィンゴ脂質 (Butters, T.D., 他 (2000). Chem. Rev. 100, 4683-4696) 上の特定のオリゴ糖構造の合成に関与する重要な分子群である。そのような酵素の特異的阻害剤を使用することにより細胞機能を調節できるため、これらの阻害剤は興味深い。グリコシド結合の酵素加水分解は一般的には、2つの必須残基 (即ち、プロトンドナーとヌクレオフィル) を必要とする通常の酸及び塩基触媒を介して行われる (Sinnott, M.L., 他 (1990). Chem. Rev. 90, 1171-1202; Rye, C.S., 他 (2000). Curr.Opin.Chem.Biol. 4, 573-580; 及びUnligil, U.M., 他 (2000) Curr.Opin.Struct.Biol. 10, 510-517)。カルボキソニウムイオンを生じる屈曲した半イス様遷移状態がこの反応に関与していると考えられる (図1)。反応性糖成分の遷移状態の形状と電荷に類似するように特

一定の方向に水酸基を有する5員のイミノシクリトールは、そのような酵素の阻害剤となる可能性が示されている (Winchester, B., 他 (1993). *Biochem. J.* 290, 743-749; Fleet, G.W.J., 他 (1985). *Tetrahedron Lett.* 26, 3127-3130; Liu, K.K.-C., 他 (1991). *J.Org.Chem.* 56, 6280-6289; Kato, A., 他 (1999) *Carbohydr.Res.* 316-95-103; Takebayashi, M., 他 (1999). *J.Org.Chem.* 64, 5280-5291; 及び Saotome, C., 他 (2000). *Bioorg.Med.Chem.* 8, 2249-2261)。カチオン様遷移状態は、グリコシルトランスフェラーゼ及びグリコシダーゼに触媒される両反応に関与することが予想されるため、5員及び6員のイミノシクリトールは両酵素の遷移状態アナログ阻害剤の開発のための中心成分として使用できる (Winchester, B., 他 (1993). *Biochem. J.* 290, 743-749; Fleet, G.W.J., 他 (1985). *Tetrahedron Lett.* 26, 3127-3130; Liu, K.K.-C., 他 (1991). *J.Org.Chem.* 56, 6280-6289; Kato, A., 他 (1999) *Carbohydr.Res.* 316-95-103; Takebayashi, M., 他 (1999). *J.Org.Chem.* 64, 5280-5291; Saotome, C., 他 (2000). *Bioorg.Med.Chem.* 8, 2249-2261; Kajimoto, T., 他 (1991). *J.Am.Chem.Soc.* 113, 6187-6196; Ichikawa, Y., 他 (1998). *J.Am.Chem.Soc.* 120, 3007-3018; Legler, G., 他 (1986). *Carbohydr.Res.* 155, 119-129; Wong, C.-H., 他 (1995). *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 34, 412-432; Wong, C.-H., 他 (1995). *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 34, 521-546; Hughes, A.B., 他 (1994). *Nat.Prod.Rep.* 135-162; 及び Qian, X., 他 (2000). *Glycosyltransferase inhibitors. In Carbohydrates in Chemistry and Biology*, (Ernst, B., Hart, G.W. & Sinay, P., ed.) vol. 3, pp.293-312, Wiley-VCH, Weinheim)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、グリコシルトランスフェラーゼ及びグリコシダーゼなどの糖鎖関連酵素の特異的阻害活性を有する化合物を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、上記した糖鎖関連酵素の特異的阻害剤を利用した医薬を提供することを解決すべき課題とした。

【0004】

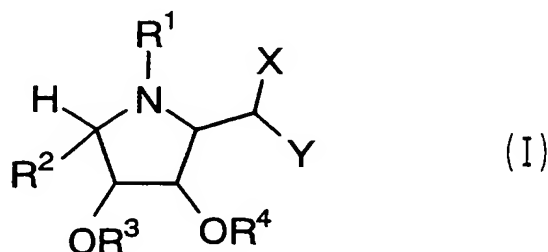
【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために検討してきた結果、一群の5員のイミノシクリトールを合成し、そのうちの幾つかの化合物がグリコシルトランスフェラーゼ及びグリコシダーゼに対する強力に興味深い阻害活性を有することを示した (Takebayashi, M., 他 (1999). J.Org.Chem. 64, 5280-5291; 及び Saotome, C., 他 (2000). Bioorg.Med.Chem. 8, 2249-2261)。本発明者らは、所望の阻害を付与する合理的な設計及び合成は、活性部位の構造に関する情報が限られているために困難であったため、5員のイミノシクリトールから誘導したコンビナトリアルライブラリーを用いる方法で所望の阻害活性を示す化合物をスクリーニングできないかどうかを検討した。本発明者らは、先ず多様性が小さいライブラリーを作製し、これらが糖鎖関連酵素の阻害剤となるかどうかを評価した。即ち、5員のイミノシクリトールに属する一連の化合物を合成し、各種のグリコシルヒドロラーゼ及びグリコシルトランスフェラーゼに対する阻害作用を評価することにより、本発明は完成するに至った。

【0005】

即ち、本発明によれば、一般式 (I) で示される化合物又はその塩が提供される。

【化7】

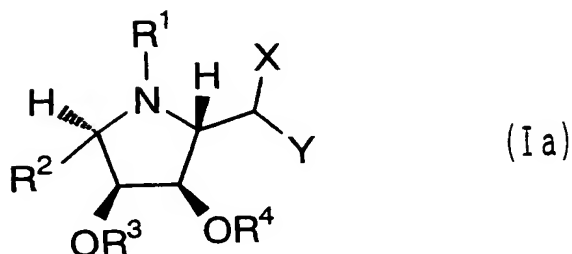


(式中、R¹は水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又はNの保護基を示し；R²は置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2～C10のアルケニル基を示し；R³及びR⁴は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示し；Xは-N(R⁵)R⁶を示し、R⁵及びR⁶は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3～C10のシクロアルキル基を示し；Yは、水素原子、-CH₂NH₂、又は-CONH₂を示す。)

【0006】

好ましくは、一般式 (I) の立体構造は以下の一般式 (Ia) である。

【化8】



(式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又はNの保護基を示し； R^2 は置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2～C10のアルケニル基を示し； R^3 及び R^4 は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示し；Xは $-N(R^5)R^6$ を示し、 R^5 及び R^6 は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3～C10のシクロアルキル基を示し；Yは、水素原子、 $-CH_2NH_2$ 、又は $-CONH_2$ を示す。)

【0007】

好ましくは、 R^2 は $-CH_2OR^{12}$ （ただし、 R^{12} は水素原子又は水酸基の保護基を示す）である。

【0008】

本発明の別の側面によれば、上記した一般式 (I) の化合物又はその塩を含む糖鎖関連酵素阻害剤、並びに上記した一般式 (I) の化合物又はその塩を有効成分として含む医薬が提供される。本発明の医薬は、例えば、糖鎖関連酵素の活性が上昇する疾患の治療又は予防のための医薬として使用でき、具体的には、抗ウイルス剤、抗がん剤又は免疫賦活剤として使用することができる。

【0009】

本発明のさらに別の側面によれば、薬学的に有効量の一般式 (I) の化合物又はその塩をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、糖鎖関連酵素を阻害する方法；並びに、薬学的に有効量の一般式 (I) の化合物又はその塩をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、糖鎖関連酵素の活性が上昇する疾患を治療又は

- 予防する方法が提供される。

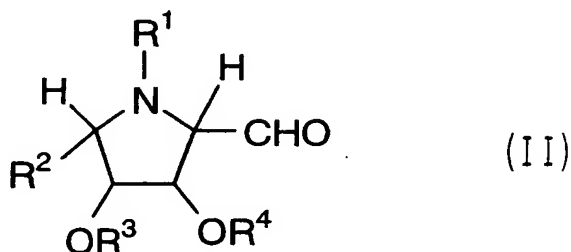
【0010】

本発明のさらに別の側面によれば、糖鎖関連酵素阻害剤の製造における一般式 (I) の化合物又はその塩の使用；並びに、医薬（具体的には、糖鎖関連酵素の活性が上昇する疾患の治療又は予防のための医薬であり、例えば、抗ウイルス剤、抗がん剤又は免疫賦活剤など）の製造における一般式 (I) の化合物又はその塩の使用が提供される。

【0011】

本発明のさらに別の側面によれば、一般式 (II) で示される化合物：

【化9】



(式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又はNの保護基を示し； R^2 は置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2～C10のアルケニル基を示し； R^3 及び R^4 は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示す)

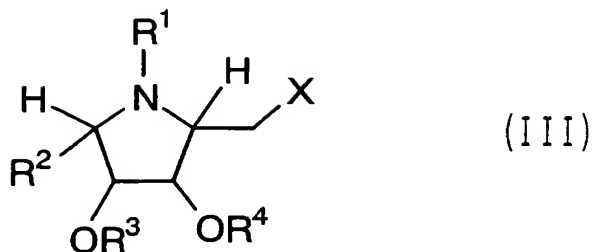
を還元剤の存在下で、

式： $X-H$

(式中、Xは、 $-N(R^5)R^6$ を示し、 R^5 及び R^6 は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3～C10のシクロアルキル基を示す)

で示される化合物と反応させて一般式 (III) で示される化合物：

- 【化 10】



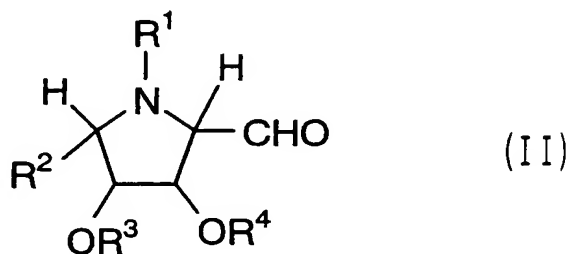
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び X は上記定義の通りである)

を製造する工程を含む、上記一般式 (I) で示される化合物の製造方法が提供される。

【0012】

本発明のさらに別の側面によれば、一般式 (II) で示される化合物：

【化 11】



(式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又はNの保護基を示し； R^2 は置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2～C10のアルケニル基を示し； R^3 及び R^4 は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示す)

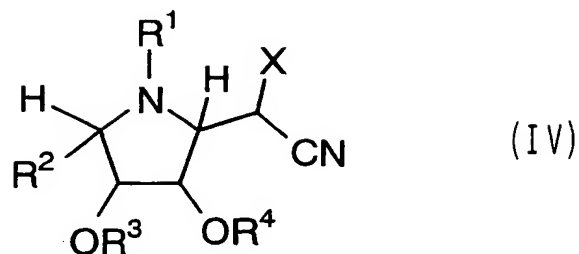
をルイス酸の存在下で、

式： $X-H$

(式中、 X は、 $-N(R^5)R^6$ を示し、 R^5 及び R^6 は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3～C10のシクロアルキル基を示す)

で示される化合物及びシアノ化剤と反応させて一般式 (IV) で示される化合物：

【化12】



(式中、R¹、R²、R³、R⁴及びXは上記定義の通りである)

を製造する工程を含む、上記一般式 (I) で示される化合物の製造方法が提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本明細書において、C1～C10のアルキル基としては、例えば、直鎖状、分岐状、環状、又はそれらの組み合わせから成る炭素数1から10のアルキル基が挙げられ、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、シクロプロピルメチル基、ペンチル基、ヘキシル基などを挙げることができる。

【0014】

本明細書において、C2～C10のアルケニル基としては、例えば、直鎖状、分岐状、環状、又はそれらの組み合わせから成る炭素数2から10のアルケニル基が挙げられ、具体的には、上記したアルキル基の中の炭素間結合の1以上が二重結合になっている基が挙げられ、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基などが挙げられる。

【0015】

本明細書において、C3～C10のシクロアルキル基としては、例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などが挙げられる。

【0016】

上記したアルキル基、アルケニル基並びにシクロアルキル基は所望により1又

はそれ以上の置換基を有していてもよい。このような置換基の種類は特に限定されないが、例えば、水酸基、オキシ基(=O)、ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい)、低級アルコキシ基(メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基など)、置換若しくは無置換のアリールオキシ基(フェノキシ基など)、アミノ基、モノアルキルアミノ基(メチルアミノ基、エチルアミノ基など)、ジアルキルアミノ基(ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、エチルメチルアミノ基など)、メルカプト基、アルキルチオ基(メチルチオ基、エチルチオ基など)、アミジノ基、グアニジノ基、ウレイド基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、アリール基(置換若しくは無置換のフェニル基など)などを挙げることができる。

【0017】

本明細書で言うNの保護基の種類は特に限定されず、当業者であれば適宜選択することができる。Nの保護基の具体例を以下に列挙するが、これらに限定されるものではない。

t-ブトキシカルボニル基、メチルカルボニル基、9-フルオレニルメチルカルボニル基、2, 2, 2-トリクロロエチルカルボニル基、2-トリメチルシリルエチルカルボニル基、ビニルカルボニル基、アリルカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、トルエンスルフォニル基、ベンゼンスルフォニル基、トリクロロメチルスルフォニル基、またはそれらの末端がレジンに結合したもの；

【0018】

本明細書で言う水酸基の保護基の種類は特に限定されず、当業者であれば適宜選択することができる。水酸基の具体例を以下に列挙するが、これらに限定されるものではない。

(エーテル型)

メチル基、メトキシメチル基、メチルチオメチル基、ベンジルオキシメチル基、t-ブトキシメチル基、2-メトキシエトキシメチル基、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル基、ビス(2-クロロエトキシ)メチル基、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル基、テトラヒドロピラニル基、3-ブロモテトラヒドロピラニル基、テトラヒドロチオピラニル基、4-メトキシテトラヒドロピラニ

ル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS、S-ジオキシド基、テトラヒドロフラニル基、テトラヒドロチオフラニル基；

【0019】

1-エトキシエチル基、1-メチル-1-メトキシエチル基、1-（イソプロポキシ）エチル基、2, 2, 2-トリクロロエチル基、2-（フェニルセレニル）エチル基、t-ブチル基、アリル基、シンナミル基、p-クロロフェニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、o-ニトロベンジル基、p-ニトロベンジル基、p-ハロベンジル基、p-シアノベンジル基、3-メチル-2-ピコリルN-オキシド基、ジフェニルメチル基、5-ジベンゾスベリル基、トリフェニルメチル基、 α -ナフチルジフェニルメチル基、p-メトキシフェニルジフェニルメチル基、p-（p'-ブromoフェナシルオキシ）フェニルジフェニルメチル基、9-アントリル基、9-（9-フェニル）キサントニル基、9-（9-フェニル-10-オキシ）アントリル基、ベンズイソチアゾリルS、S-ジオキシド基、；

【0020】

トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、イソプロピルジメチルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基（TMDMS基）、（トリフェニルメチル）ジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基、メチルジイソプロピルシリル基、メチルジ-t-ブチルシリル基、トリベンジルシリル基、トリ-p-キシリルシリル基、トリイソプロピルシリル基、トリフェニルシリル基；

【0021】

（エステル型）

ホルメート、ベンゾイルホルメート、アセテート、クロロアセテート、ジクロロアセテート、トリクロロアセテート、トリフルオロアセテート、メトキシアセテート、トリフェニルメトキシアセテート、フェノキシアセテート、p-クロロフェノキシアセテート、2, 6-ジクロロ-4-メチルフェノキシアセテート、2, 6-ジクロロ-4-（1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル）フェノキシアセテート、2, 4-ビス（1, 1-ジメチルプロピル）フェノキシアセテート、

・クロロジフェニルアセテート、p-P-フェニルアセテート、3-フェニルプロピオネート、3-ベンゾイルプロピオネート、イソブチレート、モノスクシノエート、4-オキソペンタノエート、ピバロエート、アダマントエート、クロトネート、4-メトキシクロトネート、(E)-2-メチル-2-ブテノエート、ベンゾエート、o-(ジブロモメチル)ベンゾエート、o-(メトキシカルボニル)ベンゾエート、p-フェニルベンゾエート、2, 4, 6-トリメチルベンゾエート、p-P-ベンゾエート、 α -ナフトエート；

【0022】

(カーボネート型)

メチルカーボネート、エチルカーボネート、2, 2, 2-トリクロロエチルカーボネート、イソブチルカーボネート、ビニルカーボネート、アリルカーボネート、シンナミルカーボネート、p-ニトロフェニルカーボネート、ベンジルカーボネート、p-メトキシベンジルカーボネート、3, 4-ジメトキシベンジルカーボネート、o-ニトロベンジルカーボネート、p-ニトロベンジルカーボネート、S-ベンジルチオカーボネート；

【0023】

(その他)

N-フェニルカルバメート、N-イミダゾリルカルバメート、ボレート、ニトレート、N, N, N', N'-テトラメチルホスホロジアミダート、2, 4-ジニトロフェニルスルフェネート；

なお、上記したような保護基の導入法及び脱保護法は当業者に公知であり、例えば、Teodora, W.Green, Protective Groups in Organic Synthesis, John & Wiley & Sons Inc. (1981) などに記載されている。

【0024】

一般式 (I) の化合物は、置換基の種類によっては塩の形態で存在することができる場合があるが、一般式 (I) の化合物の生理学的に許容される塩を本発明の医薬において使用することもできる。

塩の種類は特に限定されないが、例えば、酸付加塩、金属塩、アンモニウム塩、又は有機アミン付加塩等が包含される。酸付加塩としては、塩酸塩、硫酸塩、

硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、又はクエン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、又は亜鉛塩等が挙げられ、アンモニウム塩としては、アンモニウム又はテトラメチルアンモニウム等の塩が挙げられ、有機アミン付加塩としては、モルホリン又はピペリジン等の付加塩が挙げられる。

【0025】

一般式 (I) の化合物には、位置異性体、幾何異性体、互変異性体、又は立体異性体、光学異性体のような異性体が存在するが、全ての可能な異性体、並びに2種類以上の該異性体を任意の比率で含む混合物も本発明の医薬において使用することができる。一般式 (I) の化合物の立体異性体の具体例の一つを本明細書中に一般式 (Ia) として示す。

【0026】

一般式 (I) の化合物の塩を取得したい場合、一般式 (I) の化合物が塩の形態で得られる場合にはそのまま精製すればよく、また、遊離の形態で得られる場合には適当な溶媒に溶解又は懸濁させ、酸又は塩基を加えて塩を形成させ単離、精製すればよい。

また、一般式 (I) の化合物及びその塩は、水あるいは各種溶媒との付加物（水和物又は溶媒和物）の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明の医薬において使用することができる。

また、一般式 (I) の化合物及びその塩の任意の結晶形も本発明の医薬において使用することができる。

【0027】

次に、一般式 (I) の化合物の製造方法について説明する。一般式 (I) の化合物は、以下の実施例に記載したスキーム 1 に記載した通り、アルデヒド体 3 から出発して、以下の2種類の経路の何れかにより合成することができる。以下で用いる化合物 2、化合物 3、化合物 4 及び化合物 5 は、スキーム 1 に示した化合物と同義である。

【0028】

本発明で出発物質として用いるアルデヒド体 3 は公知化合物であり、Saotome, C., 他 (2000). Bioorg. Med. Chem. 8, 2249-2261 に記載の方法により合成することができる。また、一般式 (I) において、 R^1 が置換基を有していてもよい C1 ~ C10 のアルキル基である場合、 R^2 が各種の置換基を有していてもよい C1 ~ C10 のアルキル基、又は各種の置換基を有していてもよい C2 ~ C10 のアルケニル基を示す場合についても、適当な出発物質を選択し、また当業者に公知の官能基変換反応を用いて、Saotome, C., 他 (2000). Bioorg. Med. Chem. 8, 2249-2261 に記載の方法に準じて、所望の置換基を有するアルデヒド体 3 を合成することができる。

【0029】

第 1 の方法は、一般式 (I) において Y が水素原子である化合物を製造する方法である。先ず、化合物 3 を還元アミノ化して化合物 4 を製造し、次に、所望により保護基を脱保護することにより、一般式 (I) において Y が水素原子である化合物に相当する化合物 2 を合成することができる。

【0030】

化合物 3 を還元アミノ化して化合物 4 を製造する反応は、例えば、適当な不活性溶媒（例えば、トルエン等）中の化合物 3 の溶液に式 $X-H$ で示されるアミン化合物を添加し、攪拌した後、適当な不活性溶媒（例えば、THF 等）中の還元剤溶液を添加することにより行うことができる。反応温度は反応が進行する限り特に限定されず、通常は 0℃ から 50℃ 程度、好ましくは室温で行うことができる。反応時間も特に限定されず、数時間から数日間行うことができる。ここで用いることができる還元剤としては、アルデヒドを還元することなくイミンを選択的に還元する試薬が用いられるが、具体的には、例えば、 $NaBH_3CN$ などが挙げられる。反応後の反応混合物は、常法により洗浄及び乾燥などの後処理を施して、所望により脱保護反応に使用することができる。脱保護反応は、保護基の種類に応じて適宜選択することができる。

【0031】

第 2 の方法は、一般式 (I) において Y が $-CH_2NH_2$ 、又は $-CONH_2$ である化合物を製造する方法である。先ず、化合物 3 を Strecker 反応に付して化合

化合物 5 を製造し、次に、ニトリル基をアミノ基又はアミド基に変換することにより、一般式 (I) において Y が $-CH_2NH_2$ 、又は $-CONH_2$ である化合物に相当する化合物 2 を合成することができる。

【0032】

化合物 3 を Strecker 反応に付して化合物 5 を製造する反応は、例えば、適当な不活性溶媒 (例えば、トルエンなど) 中のアルデヒド体 3 の溶液に式 X-H で示されるアミン化合物を添加し、攪拌した後、シアノ化剤及びルイス酸を添加することにより行うことができる。反応温度は反応が進行する限り特に限定されず、通常は $0^{\circ}C$ から $50^{\circ}C$ 程度、好ましくは室温で行うことができる。反応時間も特に限定されず、数時間から数日間行うことができる。

【0033】

ここで用いることができるシアノ化剤としては、例えば、TMSCN (TMS シアニド)、HCN (青酸) などが挙げられる。

【0034】

また、ここで用いることができるルイス酸としては、例えば、三塩化亜鉛、三塩化アルミニウム、三フッ化ホウ素、四塩化スズ、四塩化チタン、イットリビウムトリフラートなどが挙げられる。

反応後の反応混合物は、常法により洗浄及び乾燥などの後処理を施した後に、以後の反応に使用することができる。

【0035】

次に、上記の Strecker 反応により得られた化合物 5 を以下の 2 種類の反応の何れかに付することにより、一般式 (I) において Y が $-CH_2NH_2$ 、又は $-CONH_2$ である化合物に相当する化合物 2 が得られる。

一般式 (I) において Y が $-CH_2NH_2$ である化合物を製造するためには、化合物 5 中のニトリルをアミノ基へ転換すればよい。この反応は、例えば、化合物 5 をメタノール及び塩酸に溶解し、炭素担持 $Pd(OH)_2$ を添加して、 H_2 雰囲気下で攪拌することにより行うことができる。反応温度は反応が進行する限り特に限定されず、通常は $0^{\circ}C$ から $50^{\circ}C$ 程度、好ましくは室温で行うことができる。反応時間も特に限定されず、数時間から数日間行うことができる。得られた反

反応混合物は、常法により後処理及び精製することにより、一般式 (I) において Y が $-CH_2NH_2$ である化合物に相当する化合物 2 を得ることができる。

【0036】

一般式 (I) において Y が $-CONH_2$ である化合物を製造するためには、化合物 5 中のニトリルをアミド基へ転換すればよい。この反応は、例えば、化合物 5 をメタノール及び KOH に溶解した後、過酸化水素を添加して攪拌する。得られた反応混合物を抽出し、乾燥した後、メタノール及び KOH に再度溶解し、炭素担持 Pd (OH)₂ を添加する。反応混合物を H₂ 雰囲気下で攪拌することにより目的化合物を製造することができる。反応温度は反応が進行する限り特に限定されず、通常は 0℃ から 50℃ 程度、好ましくは室温で行うことができる。反応時間も特に限定されず、数時間から数日間行うことができる。得られた反応混合物は、常法により後処理及び精製することにより、一般式 (I) において Y が $-CONH_2$ である化合物に相当する化合物 2 を得ることができる。

【0037】

本発明はさらに、一般式 (I) の化合物又はその塩を含む糖鎖関連酵素阻害剤並びに一般式 (I) の化合物又はその塩を含む医薬にも関する（本明細書中ではこれらを総称して本発明の医薬とも称する）。

本発明の医薬は、糖鎖関連酵素の活性が上昇する疾患の治療又は予防のために有用であり、例えば、抗ウイルス剤、抗がん剤又は免疫賦活剤として使用することができる。

本発明の化合物を糖鎖関連酵素阻害剤として使用する場合、対象となる糖鎖関連酵素としては、糖分解酵素（糖加水分解酵素など）、糖転移酵素などが挙げられる。

【0038】

本発明の医薬を抗ウイルス剤として使用する場合、投与対象となるウイルス疾患の種類は特に限定されない。ウイルスの感染によって起こる疾患には、日本脳炎、デング熱、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、インフルエンザ、A 型肝炎、C 型肝炎、黄熱病、出血熱、髄膜炎、小児性下痢症、狂犬病、エボラ出血熱、ラッサ熱、ポリオ、セントルイス脳炎、成人 T 細胞白血病、エイズ等があり、さらにウ

-ウイルス感染が原因と推定されている難治性疾患としては、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、亜急性硬化性全脳炎、アルツハイマー病、潰瘍性大腸炎、クローン病、川崎病、糖尿病等があることが知られている。本発明の抗ウイルス剤はこれら疾患の治療や予防のために有用である。

【0039】

本発明の医薬を抗がん剤として使用する場合、投与対象となる腫瘍または癌の種類は特に限定されず、悪性腫瘍および良性腫瘍の全てを包含し、癌腫（上皮性の悪性腫瘍）、肉腫（非上皮性の悪性腫瘍）、並びにこれらの混合型の全てを包含する。

【0040】

癌の種類はその発生部位によっても分類することもでき、例えば、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、脳腫瘍、咽頭癌、喉頭癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、肝細胞癌、脾癌、脾内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣（睾丸）腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮肉腫、陰癌、乳癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、悪性黒色腫、菌状息肉症、皮膚癌、軟部肉腫、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、形質細胞性腫瘍、褐色リンパ腫および脾内分泌腫瘍などが挙げられるが、上記具体例は癌の具体例を例示したものにすぎず、これらに限定されるわけではない。

【0041】

本発明の医薬を免疫賦活剤として使用する場合としては、例えば、感染やストレスなどによる生体の免疫能力の低下に基づくと考えられる各種疾患を予防する場合が挙げられる。具体的には、例えば、病原性細菌やウイルスの感染防御や癌の予防などを目的として使用することができる。

【0042】

本発明の医薬においては、一般式（I）で表される化合物又は生理学的に許容されるその塩、並びにそれらの水和物及び溶媒和物からなる群から選ばれる物質の1種又は2種以上を有効成分として用いることができる。異性体の任意の混合物又は純粋な形態の異性体を用いてもよい。

本発明の医薬は、1又は2以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である上記物質とを含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

【0043】

本発明の医薬は経口的又は非経口的（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）に投与することができる。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の医薬の剤形はこれらに限定されることはない。

【0044】

本発明の医薬の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的成分は当業者に周知されている。

【0045】

経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

【0046】

注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解

型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

【0047】

本発明の医薬はヒトを含む哺乳動物に投与することができる。

本発明の医薬の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $1,000\text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲である。上記投与量の医薬は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、2～4回程度）に分けて投与することもできる。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

【0048】

【実施例】

(A) 材料及び方法

(1) 材料

以下の酵素は下記の通り購入した： α -グルコシダーゼ (α -G l c - a s e； α -グルコシドグルコヒドロラーゼ；E C 3. 2. 1. 20)、Saccaromyces . Sp., (ToYoBo)； α -マンノシダーゼ (α -M a n - a s e； α -D-マンノシドマンノヒドロラーゼ；E C 3. 2. 1. 24)、Jack Bean (Sigma)； α -ガラクトシダーゼ (α -G a l - a s e； α -D-ガラクトシドガラクトヒドロラーゼ；E C 3. 2. 1. 22)、Green Coffee Bean (Sigma)； β -ガラクトシダーゼ (β -G a l - a s e； β -D-ガラクトシドガラクトヒドロラーゼ；E C 3. 2. 1. 23)、Aspergillus oryzae, (Sigma)； α -G a l N A c - a s e (2-アセトアミド-2-デオキシ- α -D-ガラクトシドアセトアミドデオキシガラクトヒドロラーゼ；E C 3. 2. 1. 49) (Chicken liverから) (Sigma)、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (β -1, 4-G a l T - a s e；E C 2. 4. 1. 22)、牛乳, (Sigma)； α -1, 3-ガラ

クトシルトランスフェラーゼ (α -1, 3-GalTase; EC 2. 4. 1. 90)、豚、組み換え体、大腸菌 (Carbiochem)。4-メチルウンベルリフェリル 2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシド (4-MUGlcNAc) は和光純薬から購入した。UDP ガラクトース及び 5'-ジホスホネート (UDP) はSigmaから購入した。カコジル酸ナトリウム塩、HEPES [2- {4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジニル} エタンスルホン酸]、MES [2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸]、 $MnCl_2$ 、テトラホウ酸ナトリウム、及び水酸化カリウムはナカライテック社から購入した。二重脱イオン水はMili-Qシステム (Millipore Corp.) で調製した。Sep-PakカートリッジはWaters Corp. から購入した。Millex-GVシリンジフィルター (0. 22 mm \times 4 mm、i. d.) は日本ミリポアから購入した。

【0049】

(2) 化学合成の一般的方法

全ての反応に乾燥溶媒を使用した。溶液は減圧下で浴温度が50℃を越えないようにして蒸発させた。カラムクロマトグラフィーは、シリカゲル (Merck Kieselgel 60) 又はIatro Beads (60 μ l) (Dia-Iatron Laboratories) で行った。ゲルろ過クロマトグラフィーは、Bio Gel P-2を用いて行った。TLCスポットはエタノール中の7%12モリブド(VI)リン酸n-ハイドレートを用いて可視化した。JEOL EX-270分光光度計を使用して25℃でNMRスペクトルを取得した。 1H NMR (270 MHz) は、内部標準として Me_4Si (δ 0. 00) 又はDOH (δ 4. 80) を使用して $CDCl_3$ 又は D_2O 中で記録した。 ^{13}C NMR (67. 5 MHz) は、内部標準として Me_4Si (δ 0. 0)、 $CDCl_3$ (δ 77. 0) 又は CD_3CN (δ 118. 2) を使用して $CDCl_3$ 又は D_2O 中で記録した。部分割当てのみを報告する。MALDI TOF質量スペクトルは、マトリックスとして2, 5-ジヒドロキシ安息香酸を用いてApplied Biosystems, Voyager上で記録した。TLCの発色はATTO写真濃度ソフトウェアライブラリーレーンアナライザー (ATTO Corp.) を用いて測定した。

【0050】

(3) グリコシル転移反応および分析の一般的方法

酵素反応は全量 $250\ \mu\text{l}$ のマイクロチューブ中で行った。反応混合物には、 $0.1\ \text{M}$ のカコジル酸塩緩衝液 ($\text{pH } 7$)、 $10\ \text{mM}$ の MnCl_2 、 $0.1\ \text{mM}$ の UDP-Gal 、 $0.2\ \text{mM}$ の 4-Mu-グリコシド、 $0.5\ \text{mM}$ の阻害剤、及び $20\ \text{mU/mL}$ のガラクトシルトランスフェラーゼを含めた。 37°C で5分間インキュベーションした後、 $0.1\ \text{M}$ のホウ酸溶液を $50\ \mu\text{l}$ 添加して 80°C で10分間加熱することによって反応を停止した。得られた混合物をMillex GV フィルターを用いてろ過し、沈殿物を除去した。

【0051】

反応速度分析を、i. d. $75\ \mu\text{m}$ の融合シリカキャピラリーを備えた Waters Quanta 4000E キャピラリー電気泳動システムで行った。試料を $10\ \text{cm}$ 高い所で10秒間静水力学的压力により充填した。検出は、カソードから $7.5\ \text{cm}$ のところで $214\ \text{nm}$ でUV吸収をカラム上で測定することにより行った。フェログラムはMillennium 2010システム (Waters Corp.) 上に記録した。

【0052】

(4) 化合物3の還元アミン化の典型的な方法

トルエン ($300\ \mu\text{l}$) 中のアルデヒド体3 ($9\ \text{mg}$, $0.017\ \text{mmol}$) の溶液にフェネチルアミン ($4.4\ \mu\text{L}$, $0.035\ \text{mmol}$) を 0°C で添加し、室温で2時間攪拌し、THF ($51.0\ \mu\text{L}$, 3当量) の NaBH_3CN の $1\ \text{M}$ 溶液を 0°C で添加し、室温で一晩攪拌した。混合物を酢酸エチルで希釈し、飽和 NaHCO_3 で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥した。還元アミン化の転換率をTLCの写真濃度分析で求めた。スポットはモリブドホスフェート試薬で可視化した。保護されたイミノシクリトールに対応するUV陽性スポットのみを分析した。
Yields (%): 4(1), 98.1; 4(2), 42.4; 4(3), 80.3; 4(4), 57.5; 4(5), 80.9; 4(6), 61.0; 4(7), 54.9; 4(8), 79.4; 4(9), 80.3.

【0053】

溶媒の除去後、残渣をメタノール ($0.8\ \text{mL}$) 及び $1\ \text{M}$ の HCl ($0.2\ \text{mL}$) に溶解し、 H_2 雰囲気下で室温で2日間、触媒量の $20\% \text{Pd}(\text{OH})_2$ と一緒に攪拌した。触媒及び溶媒を除去した後に得られた粗物質を H_2O ($1\ \text{mL}$) に溶解して、Dowex 1X8(OH form) と一緒に室温で30分間攪拌した。溶媒をろ過

及び除去した後、残渣をH₂Oに溶解し、1 MのHCl (10 mL) 及び水 (20 mL) で前処理したWaters Sep-Pak Plus CMカートリッジに装着した。カートリッジをH₂O (20 mL) で洗浄し、10% NH₃ (10 mL) で溶出した後、Millex GVフィルターでろ過し、凍結乾燥して化合物2 (8, 1) (2.5 mg、化合物3から53%) を得た。平行した反応で、2(1,1) (55%), 2(2,1) (65%), 2(3,1) (10%), 2(4,1) (80%), 2(5,1) (36%), 2(6,1) (74%), 2(7,1) (63%), 2(9,1) (29%) を得た。これらの化合物の選択した物性データを以下に示す。

【0054】

2(1,1); ¹H-NMR (D₂O): (4.20 (t, 1H, J = 3.8 Hz), 3.98 (dd, 1H, J = 4.0, 8.4 Hz), 3.84 (dd, 1H, J = 6.6, 11.2 Hz), 3.69 (dd, 1H, J = 4.7, 11.2 Hz), 3.34 (dd, 1H, J = 3.5, 6.6 Hz), 0.96 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃); MALDITOF MS Calcd. for C₁₀H₂₂N₂O₃: 218; Found: m/z 219 (M+H)⁺.

2(2,1); ¹H-NMR (D₂O): (4.19 (t, 1H, J = 3.9 Hz), 3.91 (dd, 1H, J = 4.4, 8.6 Hz), 3.84 (dd, 1H, J = 6.5, 10.9 Hz), 3.67 (dd, 1H, J = 6.6, 11.2 Hz), 2.66 (s, 6H, N(CH₃)₂).

2(3,1); ¹H-NMR (D₂O): (4.19 (t, 1H, J = 3.5 Hz), 3.97 (dd, 1H, J = 3.9, 7.8 Hz), 0.89 (t, 3H, J = 6.7 Hz, CH₃); MALDITOF MS Calcd. for C₁₆H₃₄N₂O₃: 302; Found: m/z 303 (M+H)⁺.

2(4,1); ¹H-NMR (D₂O): (4.19 (t, 1H, J = 3.8 Hz), 3.96 (dd, 1H, J = 4.3, 8.5 Hz); MALDITOF MS Calcd. For C₈H₁₈N₂O₄: 206; Found: m/z 207 (M+H)⁺.

【0055】

2(5,1); ¹H-NMR (D₂O): (4.30 (t, 1H, J = 3.5 Hz), 4.19 (dd, 1H, J = 3.5, 8.6 Hz); MALDITOF MS Calcd. For C₁₆H₂₈N₂O₃: 296; Found: m/z 297 (M+H)⁺.

2(6,1); ¹H-NMR (D₂O): (4.19 (t, 1H, J = 3.8 Hz), 3.94 (dd, 1H, J = 4.2, 8.3 Hz), 3.82 (dd, 1H, J = 6.8, 11.3 Hz), 3.67 (dd, 1H, J = 6.2, 11.3 Hz), 3.58 (t, 2H, J = 6.3 Hz), 3.38 (s, 3H, OCH₃), 2.93 (dd, 1H, J = 4.7, 12.2 Hz), 2.81 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 1.85 (quinter, 2H, J = 6.8 Hz); MALDITOF MS Calcd. For C₁₀H₂₂N₂O₄: 234; Found: m/z 235 (M+H)⁺.

2(7,1); $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): (4.24 (t, 1H, $J = 3.6$ Hz), 4.19 (t, 1H, $J = 3.7$ Hz), 4.03 (dd, 1H, $J = 4.1, 8.6$ Hz); MALDITOF MS Calcd. For $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$: 246; Found: m/z 247 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

2(8,1); $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): (7.43-7.35 (m, 5H), 4.16 (t, 1H, $J = 4.0$ Hz), 3.90 (dd, 1H, $J = 3.9, 8.2$ Hz), 3.80 (dd, 1H, $J = 6.9, 11.1$ Hz); MALDITOF MS Calcd. For $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$: 266; Found: m/z 267 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

2(9,1); $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): (4.18 (t, 1H, $J = 3.4$ Hz), 3.96 (dd, 1H, $J = 4.4, 8.3$ Hz), 3.82 (dd, 1H, $J = 6.6, 10.8$ Hz), 3.67 (dd, 1H, $J = 6.6, 10.5$ Hz); MALDITOF MS Calcd. For $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$: 244; Found: m/z 245 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

【0056】

(5) 化合物3のStrecker反応の典型的方法

トルエン (700 μL) のアルデヒド体3 (24 mg, 0.045 mmol) の溶液にフェネチルアミン (6.9 μL , 0.054 mmol) を0℃で添加し、室温で2時間攪拌し、 TMSCN (18.1 μL , 0.14 mmol) 及び THF (9.0 μL , 0.1当量) 中の塩化亜鉛の0.5 M溶液を0℃で添加し、室温で一晩攪拌した。混合物を酢酸エチルで希釈し、飽和 NaHCO_3 で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥した。溶媒を除去した後、ニトリル化合物5 (8) の粗物質 (29 mg, 96.0% p (6:4)) を得た。ここで% p は、TLCの写真濃度分析で求めた粗混合物中の生成物の純度を意味し、後ろの括弧内の数字はジアステレオアイソマーの比率を示す。これらのうちで比率がないものは立体異性体が同一の R_f を有していたことを示す。スポットはモリブドホスフェート試薬で可視化した。保護されたイミノシクリトールに対応するUV陽性スポットのみを分析した。平行した反応で、化合物5 (1) (43 mg, 81.9% p (1:1)), 化合物3 (39 mg, 0.074 mmol) から、化合物5 (2) (26 mg, 58.2% p, 化合物3 (27 mg, 0.052 mmol) から)、化合物5 (3) (27 mg, 91.2% p (6:4), 化合物3 (28 mg, 0.053 mmol) から)、化合物5 (4) (29 mg, 67.8% p, 化合物3 (27 mg, 0.051 mmol) から)、化合物5 (5) (30 mg, 70.6% p, 化合物3 (24 mg, 0.046 mmol) から)、化合物5 (6) (2

-7 mg, 56.9% p (6:4), 化合物 3 (25 mg, 0.046 mmol) から)、化合物 5 (7) (26 mg, 87.5% p (6:4), 化合物 3 (26 mg, 0.048 mmol) から)、及び化合物 5 (9) (30 mg, 57.0% p, 化合物 3 (26 mg, 0.050 mmol) から)を得た。これらの化合物を精製することなく次の反応に使用した。選択した物性データを以下に示す。

【0057】

5(1); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (3.62 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, CHCN), 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.91 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 119.35 and 118.65 (CN), 80.99 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 13.84 (CH_3); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_5$: 613; Found: m/z 614 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

5(2); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (3.63 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, CHCN), 2.22 (s, 6H), 1.44 (s, 9H); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_5$: 628; Found: m/z 629 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

5(3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (4.12 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz), 3.63 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, CHCN), 1.43 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, $J = 6.4$ Hz); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_5$: 697; Found m/z 698 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 720 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 736 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

5(4); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (1.44 (s, 9H); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_6$: 601; Found: m/z 602 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 624 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

5(5); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (3.64 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, CHCN), 1.46 (s, 9H); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_5$: 691; Found: m/z 692 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

【0058】

5(6); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (3.63 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, CHCN), 3.31 (s, 3H), 1.44 (s, 9H).

5(7); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (3.63 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, CHCN), 1.43 (s, 9H); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_6$: 641; Found: m/z 642 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

5(8); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (4.26 (dt, $J = 2.5, 7.0$ Hz, 1H), 3.94 (d, 2H, $J = 4.1$ Hz), 3.61 (t, 1H, $J = 6.5$ Hz), 1.44 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 118.58 (CN), 81.00 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.14 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_5$: 661; Found: m/z 662 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

5(9); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (4.14 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz), 3.98 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz),

3.63 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz, CHCN), 1.45 (s, 9H): MALDITOF MS Calcd. for $C_{39}H_{49}N_3O_5$: 639; Found m/z 640 (M+H)⁺.

【0059】

(6) ニトリルのアミノ基への典型的な転換反応: 化合物 2 (8, 2) の合成
メタノール (0.8 mL) 及び 1 M の HCl (0.2 mL) に溶解した粗化合物 5 (8) (8 mg, 化合物 2 (7 mg, 0.013 mmol) に対応) の溶液に、触媒量の炭素担持 20% Pd(OH)₂ を添加した。反応混合物を H₂ 雰囲気下で室温で 4 日間攪拌した。触媒及び溶媒を除去した後に得られた粗物質を H₂O (1 mL) に溶解して、Dowex 1X8(OH form) と一緒に室温で 30 分間攪拌した。溶媒をろ過及び除去した後、残渣を H₂O に溶解し、1 M の HCl (10 mL) 及び水 (20 mL) で前処理した Waters Sep-Pak Plus CM カートリッジに装着した。カートリッジを H₂O (20 mL) で洗浄し、10% NH₃ (10 mL) で溶出した後、Millex GV フィルターでろ過し、凍結乾燥して化合物 2 (8, 2) (2.3 mg, 化合物 3 から 58%) を得た。平行した反応で、2(1,2) (51%), 2(2,2) (41%), 2(3,2) (8%), 2(4,2) (41%), 2(5,2) (32%), 2(6,2) (31%), 2(7,2) (27%), 2(9,2) (12%) を得た。選択した物性データを以下に示す。

【0060】

2(1,2); ¹H-NMR (D₂O): (0.90 (t, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH₃).

2(2,2); ¹H-NMR (D₂O): (1.95 (s, 6H);

2(3,2); MALDITOF MS Calcd. for $C_{17}H_{37}N_3O_5$: 331; Found: m/z 332 (M+H)⁺.

2(4,2); ¹H-NMR (D₂O): (3.75 (t, $J = 5.6$ Hz), 3.00 (t, $J = 5.6$ Hz); MALDITOF MS Calcd. for $C_9H_{21}N_3O_4$: 235; Found: m/z 236 (M+H)⁺, 274 (M+K)⁺.

2(5,2); MALDITOF MS Calcd. For $C_{17}H_{31}N_3O_3$: 325; Found: m/z 326 (M+H).

2(8,2); MALDITOF MS Calcd. for $C_{15}H_{25}N_3O_3$: 295; Found: m/z 296 (M+H)⁺.

2(9,2); MALDITOF MS Calcd. for $C_{13}H_{27}N_3O_3$: 273; Found: m/z 274 (M+H)⁺, 312 (M+K)⁺.

【0061】

(7) ニトリルのアミド基への典型的な転換反応: 化合物 2 (1, 3) の合成
メタノール (0.8 mL) 及び 6 M の KOH (0.2 mL) 中の粗化合物 5 (

1) (8 mg, 化合物 3 (10 mg, 0.018 mmol) に対応) の溶液に、30% H_2O_2 (17 μL , 0.15 mmol) を添加した。反応混合物を 50℃ で 2 時間攪拌した。冷却後、反応混合物を氷水に注ぎ、 CH_2Cl_2 で抽出し、 MgSO_4 上で乾燥した。メタノール (0.8 mL) 及び 1 M の HCl (0.2 mL) に溶解したこの残渣に、触媒量の炭素担持 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2$ を添加した。反応混合物を H_2 雰囲気下で室温で 3 日間攪拌した。触媒及び溶媒を除去した後に得られた粗物質を H_2O (1 mL) に溶解して、Dowex 1X8(OH form) と一緒に室温で 30 分間攪拌した。溶媒をろ過及び除去した後、残渣を H_2O に溶解し、1 M の HCl (10 mL) 及び水 (20 mL) で前処理した Waters Sep-Pak Plus CM カートリッジに装着した。カートリッジを H_2O (20 mL) で洗浄し、10% NH_3 (10 mL) で溶出した後、Millex GV フィルターでろ過し、凍結乾燥して化合物 2 (1, 3) (1.4 mg, 化合物 3 から 28%) を得た。平行した反応で、2(2,3) (42%), 2(3,3) (15%), 2(4,3) (33%), 2(5,3) (17%), 2(6,3) (28%), 2(7,3) (12%), 2(8,3) (27%), 2(9,3) (26%) を得た。選択した物性データを以下に示す。

【0062】

2(1,3); $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): (3.34 (t, $J = 6.5$ Hz), 0.92 (t, $J = 6.2$ Hz); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$: 261; Found: m/z 262 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; Before hydrogenolysis; MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_6$: 631; Found: m/z 632 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

2(2,3); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$: 276; Found: m/z 277 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; Before hydrogenolysis; MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_6$: 646; Found: m/z 647 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 685 ($\text{M}+\text{K}$)⁺.

2(3,3); $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): (0.89 (t, 3H, $J = 6.0$ Hz); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$: 345; Found: m/z 346 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

2(4,3); $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): (3.00 (t, $J = 5.2$ Hz); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$: 249; Found: m/z 250 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; Before hydrogenolysis; MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_7$: 619; Found: m/z 620 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 642 ($\text{M}+\text{Ha}$)⁺.

【0063】

2(5,3); MALDITOF MS Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$: 339; Found: m/z 340 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; B

efore hydrogenolysis:

MALDITOF MS Calcd. for $C_{43}H_{55}N_3O_6$: 709; Found: m/z 710 (M+H)⁺.

2(6,3); 1H -NMR (D_2O): (3.54 (t, J = 6.3 Hz), 3.35 (s, 3H); MALDITOF MS Calcd. for $C_{11}H_{23}N_3O_5$: 277; Found: m/z 278 (M+H)⁺.

2(7,3); MALDITOF MS Calcd. for $C_{12}H_{23}N_3O_5$: 289; Found: m/z 290 (M+H)⁺; Before hydrogenolysis: MALDITOF MS Calcd. for $C_{38}H_{49}N_3O_7$: 659; Found: m/z 660 (M+H)⁺.

2(8,3); MALDITOF MS Calcd. for $C_{15}H_{23}N_3O_4$: 309; Found: m/z 310 (M+H)⁺, 322 (M+Na)⁺; Before hydrogenolysis: 1H -NMR ($CDCl_3$): (6.58, 6.46, 5.39, 5.22 (br. s, CONH₂); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) (175.20 and 174.68 (CONH₂), 155.38 (NCOO), 28.38 (CH₃); MALDITOF MS Calcd. for $C_{41}H_{49}N_3O_6$: 679; Found: m/z 680 (M+H)⁺,

2(9,3); MALDITOF MS Calcd. for $C_{13}H_{25}N_3O_4$: 287; Found: m/z 288 (M+H)⁺; Before hydrogenolysis: MALDITOF MS Calcd. for $C_{39}H_{51}N_3O_6$: 657; Found: m/z 658 (M+H)⁺.

【0064】

(8) グリコシダーゼに対するライブラリーのスクリーニング

インキュベーションはマイクロタイタープレートウエル (50 μ L/ウエル)で行った。反応混合物には、適当な緩衝液 (α -グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ及び β -ガラクトシダーゼについては40 mMのリン酸緩衝液 (pH 7)、 α -マンノシダーゼについては20 mMの酢酸緩衝液 (pH 5)、 α -ガラクトサミニダーゼについては40 mMのクエン酸緩衝液 (pH 4))、1 mMのPNP-グリコシド、所定量の阻害剤 (1 nM~1 mM)、及びグリコシダーゼ (0.4 U/mLの α -グルコシダーゼ、0.2 U/mLの α -ガラクトシダーゼ、1 U/mLの β -ガラクトシダーゼ、0.2 U/mLの α -マンノシダーゼ、0.6 U/mLの α -ガラクトサミニダーゼ)を含めた。化合物2 (3, Y)の場合には、化合物をDMSOに溶解し、H₂Oで希釈することにより (H₂O : DMSO = 6 : 1 (v/v))、ストック5 mM溶液を先ず調製し、溶液の一部を各反応に使用した。室温で5分間インキュベートした後、0.2 Mの炭酸ナ

・トリウム $50\ \mu\text{L}$ を添加して反応を停止した。各実験は二重で行った。ライブラリーの一連の化合物の阻害の結果を図 6 (A から F) に示す。

【0065】

(9) $\alpha-1, 3\text{-GalTase}$ のアッセイ

インキュベーションは反応速度分析のために各時間 (1 ~ 15 分間) について $\alpha-1, 3\text{-Galactosyltransferase}$ の存在下で pH 6.5 で行った。 $\alpha-1, 3\text{-GalTase}$ に対するイミノ糖の阻害アッセイは、0.5 mM のイミノ糖の存在下で 5 分間、反応速度分析と同一の条件下で行った。これらのイミノ糖は何れも $\alpha-1, 3\text{-GalTase}$ に対して阻害活性を示さなかった。

電気泳動は、60 cm の融合シリカキャピラリーを用いて 15 kV で行った。アクセプター 4-MU-LacNAc (6) 及び生成物 4-MU-Gal- $\alpha 1-3\text{-Gal-}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ (7) の移動時間は各々、9.3 分及び 10.0 分であった。Sep-Pak C18 後の反応混合物の質量スペクトル分析は満足なデータを与えた。

MALDITOF MS;

化合物 6: Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_{13}$: 541; Found: m/z 564 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺,

化合物 7: Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{NO}_{18}$: 703; Found: m/z 726 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺

【0066】

(10) $\beta-1, 4\text{-GalTase}$ に対するライブラリーのスクリーニング

インキュベーションは反応速度分析のために各時間 (1 ~ 15 分間) について $\beta-1, 4\text{-GalTase}$ の存在下で pH 7.0 で行った。イミノ糖の阻害アッセイは、0.5 mM のイミノ糖の存在下で 5 分間、反応速度分析と同一の条件下で行った。阻害の結果を図 4 (G) に示す。

電気泳動は、49 cm の融合シリカキャピラリーを用いて 20 kV で行った。50 mM のホウ酸ナトリウムを電解質として使用した。アクセプター 4-MU-

- ・ G l c N A c 及び生成物 4 - M U - L a c N A c (6) の移動時間は各々、2.4 分及び 2.6 分であった。

【0067】

(B) 結果および考察

(1) コンビナトリアルライブラリーの合成

本実施例では、ピロリジン環の立体配置に応じてガラクト型 (1 a) 又はマンノ型 (1 b) の何れかとなる、2 (S)、3 (R)、4 (S)、5 (R) - 立体配置を有する 5 員のイミノシクリトールを選択した (図 2)。5 員環系は 6 員環系よりも立体配置的に柔軟であり、生理的条件では多様な立体配置の均衡として存在する。従って、両方の立体配置 (1 a 及び 1 b) は糖鎖関連酵素研究の構造上の候補と考えるべきである。5 員系の特徴はコンビナトリアルライブラリーのリード構造として有利であると考えられる、この場合にはさらなる特異性や親和性を構造 2 に官能基を添加することによって引き出すことができる。異なる立体配置は結合特異性に関して対応する酵素ファミリーを目的とするものであり、これらの立体配置 (2 a 及び 2 b) をライブラリー中の「立体配置多様性因子」として処理できると考えた (図 3)。

【0068】

糖鎖関連酵素を目的とした炭水化物関連のライブラリーの報告はほとんど存在しない (Nilsson, U.J., 他 (1998). *Bioorg.Med.Chem.* 6, 1563-1575; Wischnat, R., 他 (1998). *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 8, 3353-3358; Lohse, A., 他 (1999). *Bioorg.Med.Chem.* 7, 1965-1971; Lohse, A., 他 (1999). *Tetrahedron Lett.* 40, 3033-3036; Takayanagi, M., 他 (2000). *J.Org.Chem.* 65, 3811-3815; 及び Malet, C., 他 (1997). *Carbohydr.Res.* 303, 51-65)。遷移状態阻害剤 (Wischnat, R., 他 (1998). *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 8, 3353-3358; Lohse, A., 他 (1999). *Bioorg.Med.Chem.* 7, 1965-1971; Lohse, A., 他 (1999). *Tetrahedron Lett.* 40, 3033-3036; 及び Takayanagi, M., 他 (2000). *J.Org.Chem.* 65, 3811-3815) に基づく試みは特に興味深い。多様性が生成する仕組みについては複数の可能性が存在する。即ち、直線型 (二重官能化合物合成ユニットの反復反応を含む)、足場型 (鋳型と複数の官能基との反応を含む)、及びカスケード型 (反応産

物が次の反応のための別の機能を付与する)である (Balkenhohl, F., 他 (1996). *Angew. Chem. Int. Ed.* 35, 2288-2337)。対象となる一連の分子は低分子量であること、並びに、関連酵素の結晶写真データによればタンパク質表面の約 100 Å を覆う標的酵素の主な触媒部位に合致する必要があることを考慮すれば (Murali, R., 他 (1994). *J. Mol. Biol.* 239, 578-580; Jacobson, R.H., 他 (1994). *Nature*. 369, 761-766; Gastinel, L.N., 他 (1999). *EMBO J.* 18, 3546-3557; Uitendhaag, J.C.M., 他 (1999). *Nat. Struct. Biol.* 6, 432-436; 及び Vallee, F., 他 (2000). *EMBO J.* 19, 581-588)、作製した分子に追加される官能性は散乱すべきではなく、イミノシクリトールであるコアユニットに隣接して縮合すべきである。

【0069】

化合物 1 の多様性を誘導するために、C 1' 位のアルデヒド基を使用した。これは、疎水度の増加は細胞膜の通過には有利であるが (Fleet, G.W.J., 他 (1998). *FEBS Lett.* 237, 128-132; Karpas, A., 他 (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.* 85, 9229-9233; 及び Asano, N., 他 (1995). *J. Med. Chem.* 38, 2349-2356)、環窒素の N-アルキル化により分子レベルでの阻害が減少する場合が多いという知見に基づくものである (Takebayashi, M., 他 (1999). *J. Org. Chem.* 64, 5280-5291; 及び Saotome, C., 他 (2000). *Bioorg. Med. Chem.* 8, 2249-2261)。アルデヒド体 3 を既報の通り合成し、ライブラリーを作製するために使用した (Saotome, C., 他 (2000). *Bioorg. Med. Chem.* 8, 2249-2261)。まず、還元アミン化、Strecker 縮合、Ugi 型反応および Mannich 反応を含む各種の反応条件のために、化合物 3 とアミンとの反応によって形成したイミンを利用し、生成物のアシル化によってポリエチレングリコール (PEG) を導入して多様性を増大し、反応混合物からの縮合生成物のフィッシュアウト処理を容易にした。しかし、そのような反応では、十分な結果を与えない反応があった。この原因は、反応部位周辺のアミンの t-ブチルカルボニル (Boc)、ベンジル (Bn) 及び X の立体障害であることが示唆された。適用可能と判明した反応は、アシル化を伴わない、還元アミン化と Strecker 反応であった。イミノシクリトールに基づいたライブラリーでは大きい多様性は得られなかったが、代わりにニトリル基からアミノ、ア

・ミド及びカルボン酸 (Y) への転換反応を含めることにした。選択した X 基および Y 基を図 3 に示す。

【0070】

先ず、幾つかのアミン (X-H) を用いて化合物 3 の還元アミン化反応を行った。イミンの還元は、シアノボロハイドライドナトリウムを用いた標準的条件下で円滑に進行し、化合物 4 (1-9) が得られ、これを酸性条件下で水素添加により 1 工程で脱保護し、Sep-Pak CM カートリッジを用いて高収率で化合物 2 (1-9, 1) が得られた。還元アミン化反応の個々の転換率は、TLC プレートの写真濃度分析により求め、化合物 3 は 42 ~ 98 % の収率で化合物 4 に転換した。

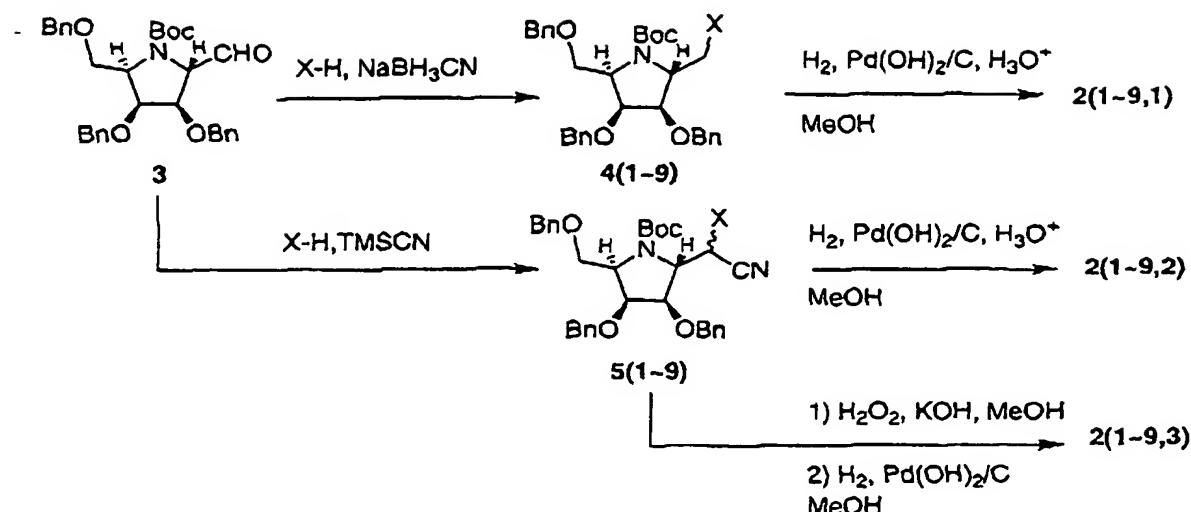
【0071】

次に、Strecker 反応を行った。9 種のアミンでイミンを形成した後に、トリメチルシリルシアニド (TMS-CN) を触媒 $ZnCl_2$ の存在下で使用した (Ojima, I., 他 (1975). Chem. Lett. 737-740) (スキーム 1、図 3)。ルイス酸なしでは反応は進行しなかった。何れの場合も有意な立体選択性は見られなかったことから、ルイス酸はイミン中間体を直接活性化し、副次的影響は見られなかったもので他の官能基を介して活性化しているのではないことが示唆された。縮合産物を単離することなく次の反応に付した。アルデヒド体 3 から化合物 5 への転換率は写真濃度によれば 57 ~ 97 % の範囲であった。混合物を加水分解及び還元などの各反応条件に付して、ニトリル基を各々カルボキシレート、アミド及びアミンに転換した。化合物 5 (1-9) を還元してアミン 2 (1-9, 2) に転換する反応は、酸性水素添加条件下で行い、同時に Boc と Bn を除去した。ニトリル基を加水分解してカルボン酸及びアミド (Y) を得ようとした場合、酸性及び塩基性の水素添加条件により共に複雑な混合物が得られた。そこで、化合物 5 (1-9) を酸化的にアミドに転換し、これを次に水素添加して化合物 2 (1-9, 3) を生成した。温度の上昇後でもこの条件下では、中間体からカルボキレートに転換することはできなかった。

スキーム 1 :

【0072】

【化13】



【0073】

化合物 2 (X, Y) から成るライブラリーの合成;

アルデヒド体 3 の還元アミン化及びStrecker反応により化合物 4 (X) 及び 5 (Y) が生成する。化合物 5 (X) のニトリル基はさらに Y のアミン-及びアミド-官能基に転換した。これらの化合物の脱保護により化合物 2 (X, Y) が生成する。

【0074】

阻害剤の候補として化合物 2 (1-9, 1) を使用して、試験すべき糖鎖関連酵素を選択した。 α -Gal-a-se、 β -Gal-a-se 及び α -GalNAc-a-se をガラクト立体配置の化合物 2 a (X, Y) (図 3) の相手として選んだ(図 3)。化合物 1 は $27 \mu\text{M}$ の $K_{1/2}$ 値を有する UDP-Gal に対する β -1, 4-GalT-a-se の阻害剤であるので、2 種類のグリコシルトランスフェラーゼ (即ち、 β -1, 4-GalT-a-se および α -1, 3-GalT-a-se) も含めた (Saotome, C., 他 (2000). Bioorg.Med.Chem. 8, 2249-2261)。同様に、 α -Man-a-se を、マンノ立体配置化合物 2 b (X, Y) のために選択した。 α -Glc-a-se も追加した。

【0075】

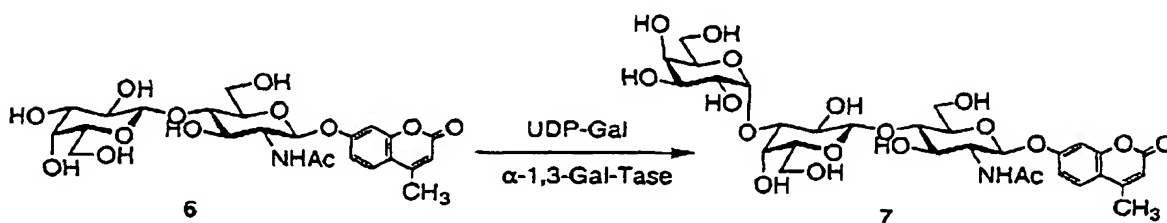
(2) 糖鎖関連酵素に対するライブラリーのスクリーニング

α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼに対するライブラリー化合物の阻害効果をアッセイするために (Sharma, A., 他 (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 7190-7195; Sujino, K., 他 (1998). Carbohydr. Res. 305, 483-489; Chen, X., 他 (1999). Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 650-658; 及び Takayama, S., 他 (1999). Bioorg. Med. Chem. 7, 401-409)、先ず酵素を用いて必要な基質及び生成物を合成した。4-メチルウンベルリフェリル (4-Me) LacNAc (化合物 6) を、既報 (Kanie, Y., 他 (1998). Anal. Biochem. 263, 240-245) の方法に従って合成し、基質として使用した。トランスフェラーゼの存在下での化合物 6 と UDP-Gal との反応における化合物 7 の形成は、キャピラリー電気泳動を用いて図 4 (スキーム 2) に示す典型的なエレクトロフェログラム分析として確認した。酵素反応の時間経過分析も行った (図 5)。この条件下では、転移反応は 16 分後に完結した。化合物 7 は単離しなかったが、Sep-Pak C18 後における反応混合物の MALDI-TOF 質量スペクトル分析は、化合物 6 および化合物 7 の存在を示した。

スキーム 2:

【0076】

【化14】



【0077】

キセノトリ炭水化物の合成;

4-MU-GlcNAc から調製した 4-MU-LacNAc (6) を、UDP-Gal の存在下で α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼの作用によりキセノ抗原トリ炭水化物に転換した。

【0078】

本発明の方法の有効性を調べ、ライブラリーの構成要素がグルコシダーゼ及びグルコシルトランスフェラーゼの阻害剤となるかどうかを調べるために、阻害剤

の濃度を固定して、予備的な阻害スクリーニングアッセイを行った。各酵素反応に適した濃度を、各種濃度のライブラリーの各化合物および／又は既知の酵素阻害剤を用いた初期阻害試験により決定した。阻害は、測定した濃度での百分率で示した。各酵素反応はタイタプレートウェル中で行い、対応する基質に対する阻害を、グリコシダーゼのアッセイの場合には、p-ニトロフェノールの405 nmにおける吸収で求めた。通常の阻害剤が入手可能である場合は、結果の標準のために使用した。

【0079】

グリコシルトランスフェラーゼの阻害アッセイのために、4-Mu-GlcAc、化合物6及び7などの対応する4-MU-グルコシドを使用した。阻害反応はマイクロ遠心チューブ中で5分間行い、阻害活性は、214 nmでキャピラリー電気泳動を用いてアクセプター基質に対する転換率として測定した。

【0080】

図6に示す通り、阻害が見られなかったのでグラフを省略した α -1, 3-GalTaseを除いて、ライブラリーの一連の化合物は、試験した酵素について広い阻害スペクトルを示した。酵素に依存して、ある化合物は親化合物1と比較して阻害活性の劇的な増大を示した。そのような例は、 α -Glcase (A)、 α -Mannase (B)、 α -GalNAcase (D) 及び β -Galase (E, F) について見られた。100 μ Mの阻害濃度を有する α -Glcaseの阻害については、ある化合物は化合物1の2倍の効力を示したが、デオキシノジリマイシン(DNJ)に匹敵する阻害を示す化合物はなかった。イミノ糖から遠い疎水性は α -Mannaseの場合には好ましく、C10アルキルを有する化合物2(3, 1)は化合物1($K_i = 27 \mu$ M) (Saotome, C., 他(2000). Bioorg.Med.Chem. 8,2249-2261) 及びデオキシマンノジリマイシン(DMN, $K_i = 43 \mu$ M) (Saotome, C., 他(2000). Bioorg.Med.Chem. 8,2249-2261) に対して各々、10 μ Mでの阻害について276及び1120%の増大を示した。 α -GalNAcaseの阻害については、シアスタインBアナログのみが μ M範囲のIC₅₀値を有する阻害剤として報告されている(Nishimura, Y., 他(1996). Bioorg.Med.Chem. 4,91-96)。8種のうちの5種の化合物

は、nMのオーダーで親化合物(1)と比較して2倍以上効力が高いことが判明した。これらの中でも、フェネチル基を有する化合物2(8, 1)は467%強い活性を示した。 β -Gal-a s eの場合、試験した化合物は全てが、化合物1($K_i = 1.0$ mM)と比較して、酵素の非常に有効な阻害剤であったが(Sa otome, C., 他(2000). Bioorg.Med.Chem. 8,2249-2261)、(F)に示すように μ M範囲の弱い阻害を示した。また、化合物間で活性に有意な相違はなかったので、C-1'位の置換は結合には重要ではないことが示唆された。 β -Gal T-a s e及び α -Gal T-a s eの2つの酵素はUDP-Galをドナー基質として共有するにも拘わらず、ある化合物は β -Gal T-a s eに対して阻害を示し、 α -Gal T-a s eに対して阻害を示す化合物がなかったことは注目すべきで、本発明の化合物は、ドナー遷移状態に類似している可能性がある。

【0081】

化合物2(3, 1)及び2(8, 1)等の強い阻害効果を有することが分かった化合物を次の評価用のリード化合物として選択し、Y基の効果を調べた(図7)。化合物2(3, 2)及び2(3, 3)は、この濃度では α -Ma n-a s eに対する阻害活性をほぼ喪失した。化合物2(8, 2)及び2(8, 3)はその条件下で、化合物2(8, 1)の阻害作用の各々52.8%及び50.5%で α -Gal NA c-a s eを阻害した。

【0082】

試験した酵素については全く異なる阻害スペクトルが観察され、これはコアユニットを同一に維持しつつ、選択性がC-1'位の置換基によって制御できることを示している。また、これらの化合物は、基質特異性がガラクト系統及びマンノ系統の両方の酵素に対して阻害を示した。この結果は、ピロリジン環化合物を、ライブラリーの立体配置混合物として処理できることを意味し、当該化合物は非常に有用である。

【0083】

【発明の効果】

本発明により、新規なアザ糖化合物が提供される。本発明のアザ糖化合物はグリコシルトランスフェラーゼ及びグリコシダーゼなどの糖鎖関連酵素の特異的阻

害剤として有用であり、例えば、糖鎖関連酵素の活性が上昇する疾患の治療又は予防のための医薬として有用であり、より具体的には、抗ウイルス剤、抗がん剤又は免疫賦活剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、グリコシドの酵素加水分解反応の遷移状態を示す図である。加水分解反応は、遷移状態として屈曲した半イス様立体配置を包含する。

【図 2】

図 2 は、5 員イミノ糖 1、並びに 2 種類の可能な異性体を示す。化合物 1 はガラクトース類似体又はマンノース類似体の何れかである。異性体の間には平衡が存在する。即ち、「1 化合物」は異なる立体特異性を有する異なる一連の酵素の候補となるので、5 員イミノシクリトールは有利であると考えられる。

【図 3】

図 3 は、コンビナトリアルライブラリーの図を示す。C-1' 位で、多様性を導入し (X、Y)、その構造を示す。一連の化合物 2 (X、Y) は、ガラクト異性体 2 a 及びマンノ異性体 2 b の平衡状態にある 5 員イミノ糖を共有している。

【図 4】

図 4 は、キャピラリー電気泳動による α -1, 3-GalTase のモニタリングを示す。アクセプター及びドナー基質として化合物 6 及び UDP-Gal を各々使用した酵素反応の典型的なエレクトロフェログラムを示す。

【図 5】

図 5 は、 α -1, 3-GalTase 反応の時間経過を示す。時間経過実験は α -ガラクトシル転位反応について行った。反応は 16 分で完結した。

【図 6】

図 6 は、各種の糖鎖関連酵素に対する化合物 2 (X、1) の阻害活性を示す。

A: 1×10^{-4} M の阻害剤濃度での α -Glcase の阻害;

B: 1×10^{-5} M の阻害剤濃度での α -Manase の阻害;

C: 1×10^{-5} M の阻害剤濃度での α -Galase の阻害;

D: 1×10^{-7} M の阻害剤濃度での α -GalNAcase の阻害;

E 及び F: 各々 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 及び $1 \times 10^{-5}\text{M}$ の阻害剤濃度での β -Galactose の阻害; 及び

G: $5 \times 10^{-4}\text{M}$ の阻害剤濃度での β -1, 4-GalTase の阻害;

化合物 1 及び 8 の合成は、Saotome, C., 他 (2000). Bioorg.Med.Chem. 8, 2249-2261 に報告されている。

【図 7】

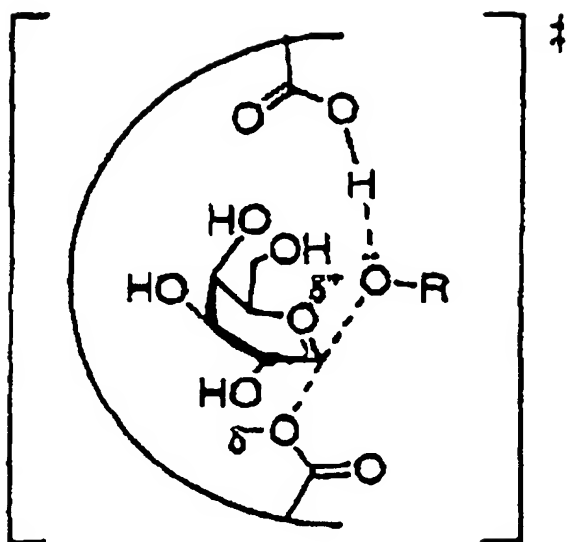
図 7 は、 α -Mannase 及び α -GalNAcase に対する化合物 2 (3, Y) 及び 2 (8, X) の阻害活性を示す。2 系統の化合物 2 (3, Y) 及び 2 (8, X) を選択して Y 基の効果を評価した。

A: $1 \times 10^{-5}\text{M}$ での α -Mannase の阻害;

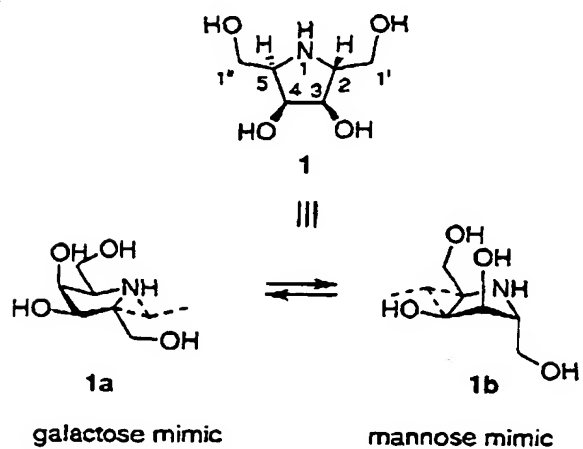
B: $1 \times 10^{-7}\text{M}$ での α -GalNAcase の阻害;

【書類名】 図面

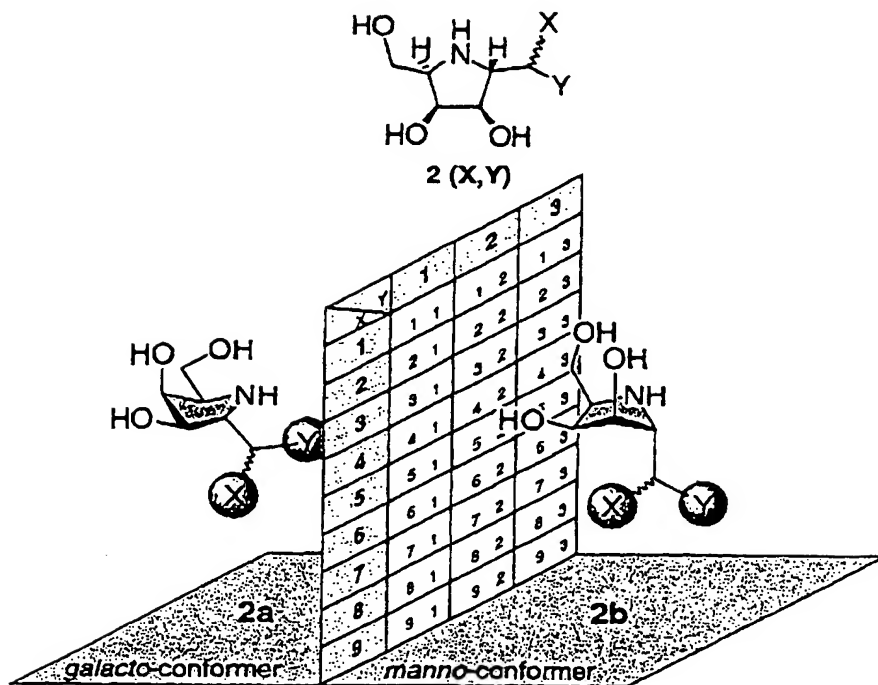
【図 1】

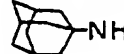
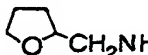
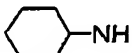


【図 2】

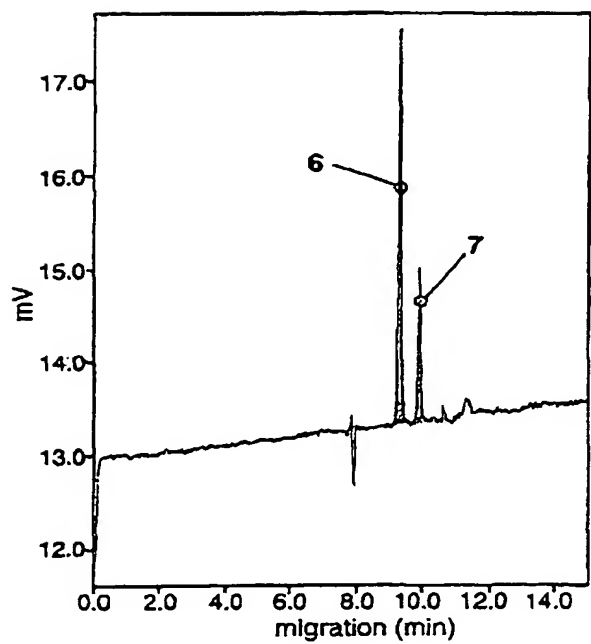


【図 3】

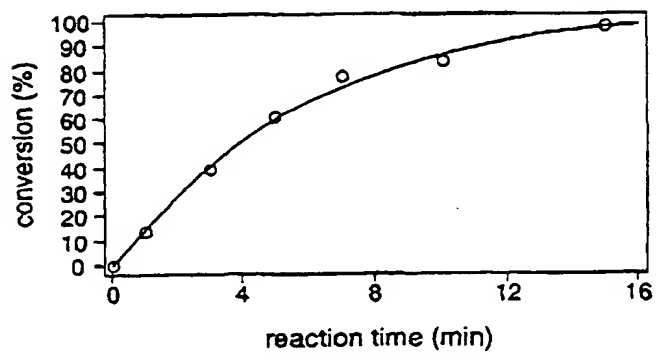


X	1: BuNH	2: (CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ NH
	3: CH ₃ (CH ₂) ₉ NH	4: HOCH ₂ CH ₂ NH
	5:  NH	6: CH ₃ O(CH ₂) ₃ NH
	7:  CH ₂ NH	8: PhCH ₂ CH ₂ NH
	9:  NH	
Y	1: H, 2: CH ₂ NH ₂ , 3: CONH ₂	

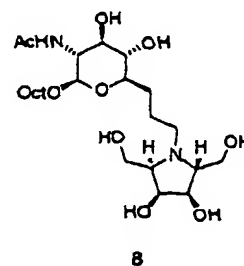
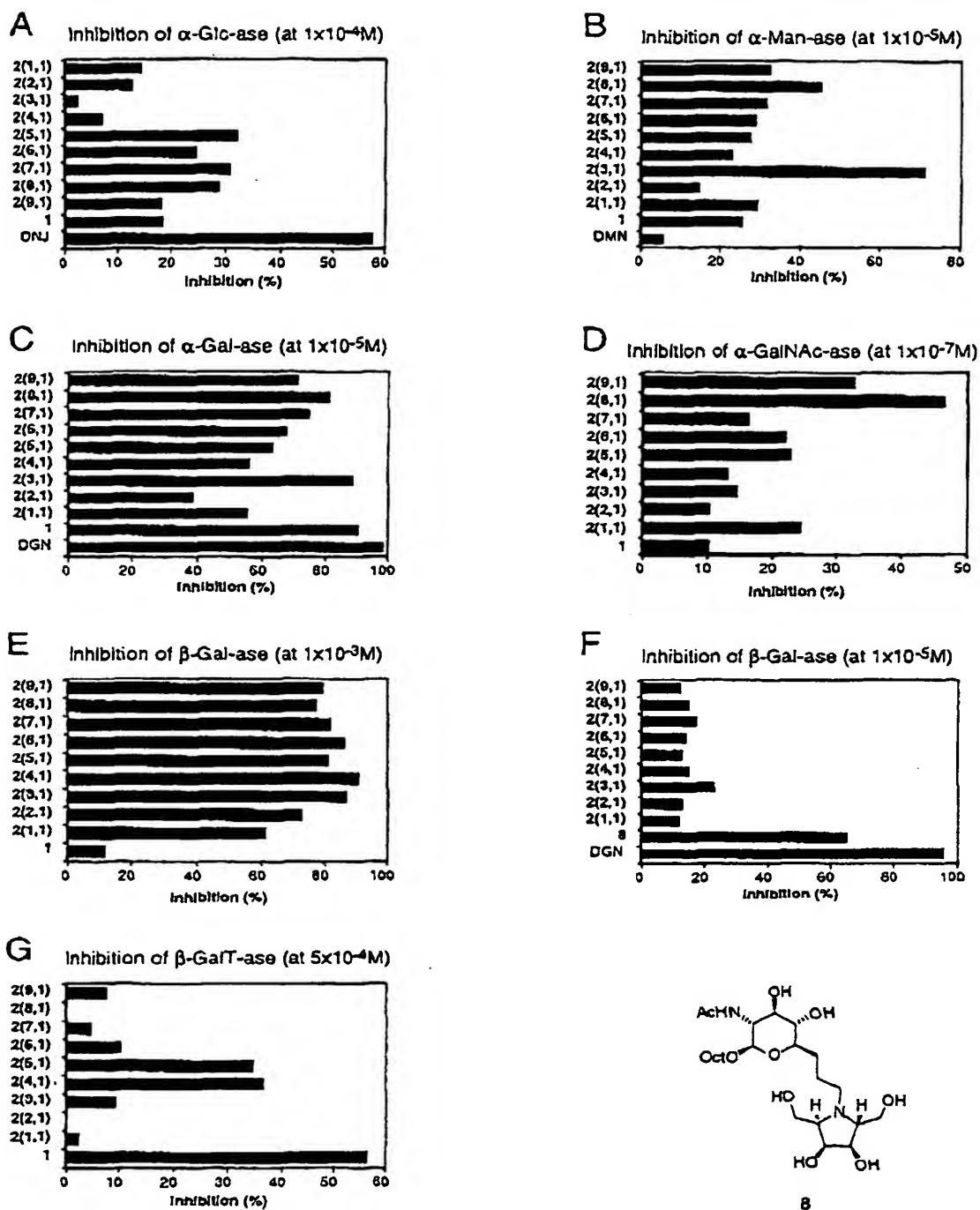
【図 4】



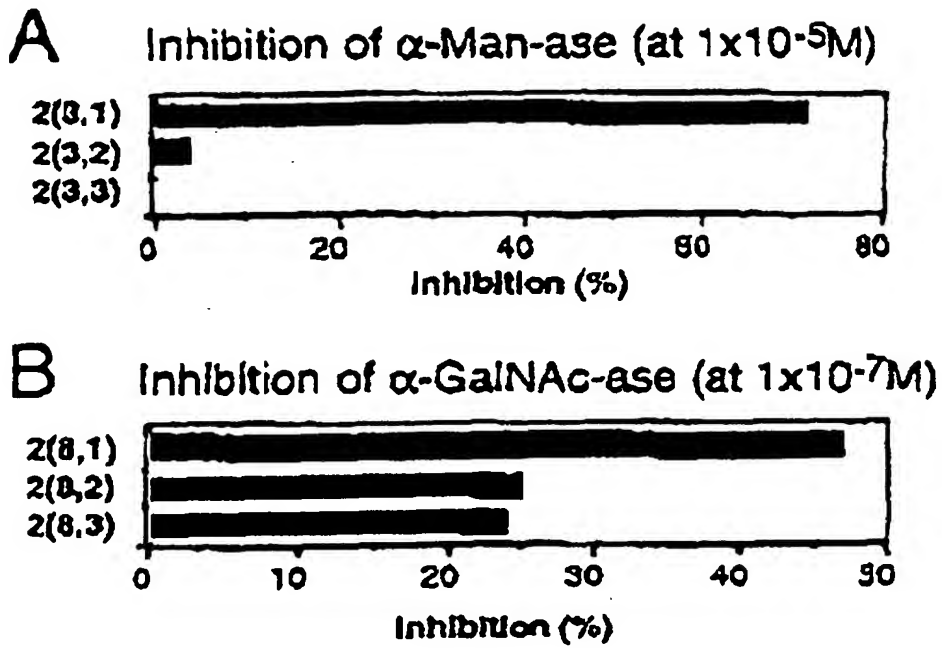
【図 5】



【図 6】



【図 7】



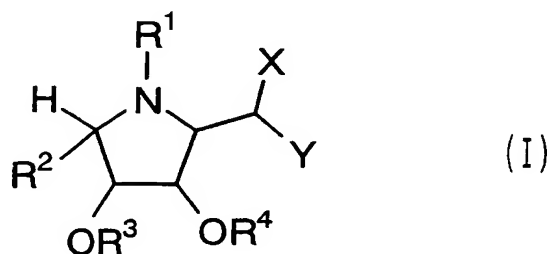
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 グリコシルトランスフェラーゼ及びグリコシダーゼなどの糖鎖関連酵素の特異的阻害活性を有する化合物を提供すること。

【解決手段】 一般式 (I) で示される化合物又はその塩。

【化1】



(式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又はNの保護基を示し； R^2 は置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基又は置換基を有していてもよいC2～C10のアルケニル基を示し； R^3 及び R^4 は各々独立に水素原子又は水酸基の保護基を示し；Xは $-N(R^5)R^6$ を示し、 R^5 及び R^6 は各々独立に水素原子、置換基を有していてもよいC1～C10のアルキル基、又は置換基を有していてもよいC3～C10のシクロアルキル基を示し；Yは、水素原子、 $-CH_2NH_2$ 、又は $-CONH_2$ を示す。)

【選択図】 なし

特願 2 0 0 1 - 1 7 3 8 5 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 9 6 8]

1. 変更年月日

1 9 9 4 年 1 0 月 2 0 日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都千代田区丸の内二丁目 5 番 2 号

氏 名

三菱化学株式会社

2. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 0 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都港区芝五丁目 3 3 番 8 号

氏 名

三菱化学株式会社